

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表 号

特表平6-504765

第3部門第2区分

(43)公表日 平成6年(1994)6月2日

(51)Int.Cl. ³	識別記号	庁内整理番号	F I
C 0 7 K 15/08		8517-4H	
A 6 1 K 37/02	ACB	8314-4C	
C 1 2 N 15/12	ZNA		
C 1 2 P 21/02		C 8214-4B	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 14 頁)

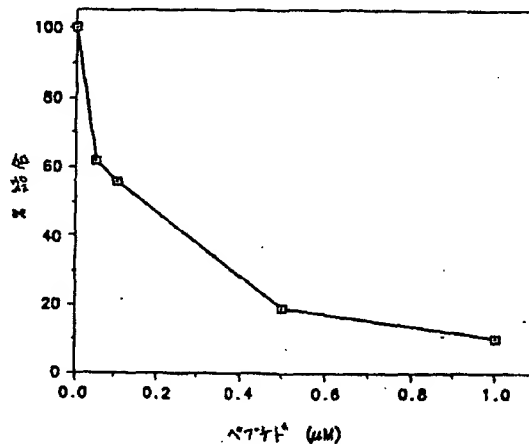
(21)出願番号 特願平4-501301
 (86)(22)出願日 平成3年(1991)11月14日
 (85)翻訳文提出日 平成5年(1993)5月17日
 (86)国際出願番号 PCT/US91/08516
 (87)国際公開番号 WO92/08472
 (87)国際公開日 平成4年(1992)5月29日
 (31)優先権主張番号 614, 443
 (32)優先日 1990年11月16日
 (33)優先権主張国 米国 (US)
 (81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, NL, S E), AU, CA, JP

(71)出願人 コー セラビューティックス、インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080
 サウス サンフランシスコ、イースト
 グランド アベニュー 256
 (72)発明者 スカボロ、ロバート エム。
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94002
 ベルモント、ベルモント キャニオン
 ロード 2544
 (74)代理人 弁理士 山本 秀策

(54)【発明の名称】 新規抗血栓症物質

(57)【要約】

抗血栓剤として有用な血小板凝集物質(PAA)は、フォン・ビルブラント因子の存在下、リストセチンまたはボトロセチンで誘発される血小板凝集を阻害するヘビ毒の活性を測定するアッセイを用いて同定されヘビ毒から得られる。本発明の抗粘着物質は、より小さなペプチドのダイマーであり、20~24kdの大きさである。これら抗粘着物質に対する抗体がまた調製され、そしてこれは、PAAのアッセイおよびPAAをコードするDNAの発現ライブラリーのスクリーニングにおいて有用である。

CHH-Bによる固定化血小板の¹²⁵I-WF結合の阻害

請求の範囲

1. 以下の群から選択されるヘビ毒から得られる、製された、および単離された形態の、血小板抗ペプチド: アグキストロドン・アクタス (*Akistrodon actus*)、アグキストロドン・ハリス・ブロモフィ (*Akistrodon halys blanchhoffi*)、アグリストロドン・コントルトリックス・モカセン (*Agkistrodon contortrix mokasen*)、ビティス・アリエタンス (*Bitis arietans*)、ビティス・コーダリス (*Bitis caudalis*)、ビティス・ガボニカ (*Bitis gabonica*)、ビティス・ジー・リノセロス (*Bitis g. rhinoceros*)、ボスロブス・アスパー (*Bothrops asper*)、ボスロブス・アルターナタ (*Bothrops alternata*)、ボスロブス・アトロックス (*Bothrops atrox*)、ボスロブス・コチアラ (*Bothrops cotilara*)、ボスロブス・ジャララカ (*Bothrops jararaca*)、ボスロブス・ニューイーディ (*Bothrops newiedi*)、ボスロブス・メデューサ (*Bothrops medusa*)、ボスロブス・シュレグリー (*Bothrops schlegelii*)、セラステス・セラステス (*Cerastes cerastes*)、セラステス・バイベラ (*Cerastes vipers*)、クロタルス・アダマンチヌス (*Crotalus adamantus*)、シー・アトロックス (*C. a. atrox*)、シー・バシリカス (*C. basiliscus*)、シー・ジュリタス・トトナカス (*C. durissus totonaticus*)、シー・エイチ・ホリダス (*C. h. horridus*)、シー・エム・モロサス (*C. m. moreau*)、シー・ルーバ (*C. ruber*)、シー・スクラタス (*C. scut*

Asp-Leu-Glu-Cys-Pro-Ser-Gly-Trp-Ser-Ser-Tyr-Asp-Arg-Tyr-Cys-Tyr-Lys-Pro-Phe-Lys-Gln-Glu-Met-Thr-Trp-Ala-Asp-Ala-Glu-Arg-Phe-Cys-Ser-Glu-Gln-Ala-Lys。

4. 前記抗粘着物質が、ヘテロダイマーであり、該ヘテロダイマーのひとつのメンバーが、約14kdの分子量を有し、そして以下のN-末端を有する、請求項1に記載の抗粘着物質:

Asp-Cys-Pro-Ser-Asp-Trp-Ser-Ser-Tyr-Glu-Gly-His-Cys-Tyr-Arg-Val-Phe-Gln-Gln-Glu-Met-Trp-Asp-Asp-Ala-Gln-Lys-Phe。

5. 前記抗粘着物質が、ヘテロダイマーであり、該ヘテロダイマーのひとつのメンバーが、約14kdの分子量を有し、そして以下のN-末端を有する、請求項1に記載の抗粘着物質:

Leu-Asp-Cys-Pro-Leu-Asp-Ser-Ser-Asn-His-Glu-Glu-Lys-Cys-Tyr-Lys-Val-Phe-Phe-Leu-Leu-Asn-Thr-Trp-Glu。

6. 前記抗粘着物質が、ヘテロダイマーであり、該ヘテロダイマーのひとつのメンバーが、約14kdの分子量を有し、そして以下のN-末端を有する、請求項1に記載の抗粘着物質:

Asp-Gln-Asp-Cys-Leu-Pro-Gly-Trp-Ser-Tyr-Tyr-Glu-Lys-Tyr-Cys-Tyr-Lys-Val-Phe-Glu。

7. 前記抗粘着物質が、ヘテロダイマーであり、該ヘテロ

dius)、シー・ブイ・セレバリス (*G. v. cerebarus*)、シー・ブイ・ヘレリ (*G. v. helleri*)、シー・ブイ・ルトス (*G. v. litous*)、シー・ブイ・オレガヌス (*G. v. orannus*)、エキス・カリナプス・ソクレキ (*Echis carinatus sokhrai*)、エリスティコフィス・マクマホニー (*Eristicophis macmahoni*)、ブノイドセラステス・ベルシカス (*Pseudocerastes persicus*)、レストルルス・エム・バルボーリ (*Sistrurus m. barbouri*)、レストルルス・シー・ターゲミナス (*Sistrurus m. tarraninus*)、トリメレスルス・フラボビリディス (*Trimeresurus flavoviridis*)、トラメレスルス・グラミウス (*Trimeresurus gramineus*)、バイベラ・レベティナ (*Vipera lebetina*)、バイベラ・アモンディタ (*Vipera ammodytes*)、バイベラ・パラスティナ (*Vipera palaestinae*)、およびバイベラ・アール・ルセリ (*Vipera z. russelli*)

2. 前記ヘビ毒が、セラステス・セラステス (*Cerastes as castes*)、シー・エイチ・ホリダス (*C. h. horridus*)、バイベラ・アール・ルセリ (*Vipera z. russelli*)、またはブノイドセラステス・ベルシカス (*Pseudocerastes persicus*)である、請求項1に記載の抗粘着剤。

3. 前記抗粘着物質が、ヘテロダイマーであり、該ヘテロダイマーのひとつのメンバーが、約14kdの分子量を有し、そして以下のN-末端を有する、請求項1に記載の抗粘着物質:

ダイマーのひとつのメンバーが、約14kdの分子量を有し、そして以下のN-末端を有する、請求項1に記載の抗粘着物質:

Asp-Cys-Pro-Ser-Asp-Trp-Ser-Ser-His-Glu-Gly-His-Cys-Tyr-Lys-Val-Phe-Asn-Leu-Tyr-Lys-Thr-Trp-Glu-Asp-Ala-Glu-Lys-Phe-Cys-Thr-Glu-Gln-Ala-Asn-Gly-Gly-His-Leu-Val-Ser-Ile-Asp-Ser-Lys-Lys-Glu-Ala-Asn-Phe。

8. 前記抗粘着物質が、ヘテロダイマーであり、該ヘテロダイマーのひとつのメンバーが、約14kdの分子量を有し、そして以下のN-末端を有する、請求項1に記載の抗粘着物質:

Ala-Leu-Asn-Cys-Ala-Ser-Gly-Trp-Ser-Ala-Tyr-Asp-Gln-His-Cys-Tyr-Lys-Ala-Phe-Asp-Glu-Pro-Lys-Ser-Trp-Ala-Asp-Asp-Glu-Lys-Phe。

9. 前記抗粘着物質が、ヘテロダイマーであり、該ヘテロダイマーのひとつのメンバーが、約14kdの分子量を有し、そして以下のN-末端を有する、請求項1に記載の抗粘着物質:

Gly-Phe-Ser-Cys-Pro-Asn-Gly-Trp-Ser-Ser-Phe-Gly-Arg-Tyr-Cys-Tyr-Lys-Pro-Ile-Glu-Pro-Leu。

10. 請求項1に記載の前記血小板抗粘着物質を、血栓形成を防止する有効量で、薬学的に受容可能な賦形剤との混合物中に含有する、製薬組成物。

11. 動物被検体において血小板粘着および血栓形成を阻害するための方法であって、そのような治療を必要とする被検体に、請求項1に記載の前記血小板粘着物質またはその製薬組成物の有効量を投与する工程を包含する方法。

12. 虚血症に伴う血小板を有する被検体を治療する方法であって、そのような治療を必要とする被検体に、請求項1に記載の前記血小板粘着物質またはその製薬組成物の有効量を投与する工程を包含する方法。

13. 動物被検体において血管形成術に続く再狭窄を防止する方法であって、そのような治療を必要とする被検体に、請求項1に記載の前記血小板粘着物質またはその製薬組成物の有効量を投与する工程を包含する方法。

14. 血液の体外循環の間の血小板損失を防止する方法であって、被検体から引き抜かれたときに、血液と請求項1に記載の前記血小板粘着物質またはその製薬組成物を接触させる工程を包含する方法。

15. 請求項1に記載の前記血小板粘着物質をコードする配列を含有する、DNA分子からなるDNA分子の組成物。

16. 血小板粘着ペプチドを産生し得る発現システムで

あって、該ペプチドは請求項1に記載の群から選択されるヘビ毒から得られ、適切な宿主に形質転換されるとき、および該宿主が発現に好適な条件下で培養されるとき、該発現システムは、該宿主に適合する制御配列に作動可能に連結された該血小板粘着性ペプチドをコードするDNAを包含する、発現システム。

17. 請求項16に記載の発現システムで形質転換された組織培養宿主。

18. 血小板粘着(PAA)ペプチドを産生する方法であって、請求項17に記載の前記宿主細胞を、該PAAペプチドをコードするDNAの発現に好適な条件下で培養する工程；および該PAAペプチドを細胞培養から回収する工程を包含する方法。

19. 請求項1に記載の前記血小板粘着物質に免疫反応性の抗体。

明 細 書

新規抗血栓性物質

技術分野

本発明は血小板粘着インヒビターに関する。さらに詳しくは、本発明は、フォン・ビルブラント因子(vWF)が血小板糖タンパク質GP1b-IX複合体と結合するのを阻害し、したがって血小板-血管壁の粘着を防止するタンパク質およびペプチドに関する。これらのペプチドのいくつかはヘビ毒中に存在する。

背景の技術

心臓血管系内の血栓症は、血管閉塞疾患の主要な機序であると考えられ、西欧社会における高い罹患率と死亡率の原因である。したがって、これらの多くの疾患を治療するため、抗血栓性物質が広く使用されている(例えば、Steinら, *Circulation*, 80巻, 1501-1513頁, 1989年参照)。しかしいずれのグループの薬剤も、すべての個体に対して完全に満足される薬剤ではなく、可能な治療剤のレパートリーへの追加は常に歓迎される。

血栓症発生の機序は複雑であるが、部分的に理解されている。アテローム性動脈硬化症斑の破裂によるか、または引き続く血管形成の間の該斑の機械的除去などの初期外傷のために、血小板-非血小板相互作用によって血小板が損傷血管

壁と粘着し、続いて血小板が凝集(血小板-血小板相互作用)するとともにフィブリンの沈着が起こる。この現象の発現は、血漿タンパク質と、特定の血小板表面糖タンパク質レセプターとの相互作用によって制御される。血小板の粘着は、損傷に対する初期の反応であると考えられるから、粘着性血小板によって仲介される血栓症および/または再狭窄を予防もしくは改善するために、阻害するのに特に望ましい標的である。

未刺激の循環血小板は数種の粘着性タンパク質に対するレセプターを含有する。このタンパク質の中で、ラミニンはVLA2およびVLA5と結合し、またコラーゲンはVLA2、GP1Vなどと結合する。血小板の内皮下層への初期の粘着は、血小板表面に存在するGP1b-IX複合体の、特に動脈血管の閉塞部位に見られる高い切断速度の条件下で血管壁に固定化されるフォン・ビルブラント因子(vWF)に対する結合によって仲介されていると考えられる。この血小板GP1b-IX複合体は、一般に休止血小板上で機能するが、通常、血液が含有するvWFを捕捉しない。通常の環境下では、動脈表面は血小板を粘着させる粘着性タンパク質リガンド(vWF)を提供しないので、血小板の粘着は血管損傷の部位に捕捉されたvWFに限定される。

捕捉されたvWFの存在によって血小板の血管内皮への粘着が保持されると、血小板は活性化されて血小板凝集体を形成し得、これに付随して、活性化されたGP1b-IIIaレセプターによって、フィブリノーゲン(Fg)および血漿が含有するvWFの結合が起こる。したがって、GP1b-IXに捕捉されたvWFの相互作用

用による未活性化血小板の粘着を、異的に阻害する物質は、特に、狭窄によって高い剪断応力がもたらされる血管内で血栓症が起こるのを阻し得る。

GP1b-IX複合体は、GP1Xと非共有結合的に複合した1b表面メンブランのヘテロダイマー(1b α と1b β)で構成され、約25,000コピー/血小板表面の密度で存在している。この複合体の欠陥が、まれな先天的出血疾患であるベルナル・スリエ症候群の原因であることが分かっており、この症候群は、血小板表面に現れるGP1b-IX複合体の欠陥、および動脈と血小板の粘着不全を特徴とする。フォン・ビルブラント病の特徴であるフォン・ビルブラント因子の欠損も、動脈と血小板の粘着不全をもたらすことが分かっている。

GP1b-IX/vWFの相互作用を妨害できる物質が知られている。Kirbyら、*Thromb Haemostasis*, 24巻, 170頁, 1975年には、エバンスブルー染料が、vWFとホルムアルデヒド固定血小板とのリストセチンによって誘発される結合をインビトロで阻害することが報告されている。Geratzら、*Thromb Haemostasis*, 33巻, 411頁, 1975年には芳香族アミノ化合物類による同じ作用が証明されている。Phillipsら、*Blood*, 72巻, 1988~1989頁, 1988年には、リストセチンによって誘発される血小板の凝集反応および血小板が豊富な血漿中での剪断力によって誘発される血小板の凝集反応は、先に発表された他の化合物より10倍低い濃度でトリフェニルメチル化合物のアウリントリカルボン酸(ATA)により有効に阻害されることを示した。ま

たATAは、冠状動脈血栓症のインビボでの有効なインヒビターであることが立証されている(Stronyら、*Circulation*, 80巻, 11-23頁(Abtract) 1989年; PCT出願第W089/04166号)。

また、vWFとGP1b-IX複合体の結合反応は、Ruanら、*Brit J Haematol* 49巻, 1911頁, 1981年とCollerら、*Blood*, 61巻, 88頁, 1983年とに開示されているように、GP1b-IX複合体と免疫反応性のモノクローナル抗体類によって阻害される。これらの抗体は、vWFと血小板のリストセチン誘発結合反応を阻害する。Beckerら、*Blood*, 74巻, 490~494頁, 1989年には、これらの抗体もしくはその免疫反応性フラグメントの1つは、モルモット中でのGP1bの糖鎖をインビボでブロックするが、ADP、コラーゲンもしくはトロンビンによって誘発される血小板凝集反応に対しては全く効力を発揮しない。

ヒトvWFに対して免疫反応性のモノクローナル抗体は、高剪断速度下での血小板とコラーゲンの粘着をブロックする(Prassinaudら、*J Lab Clin Med*, 112巻, 58~67頁, 1988年, およびCadroyら、*Circulation*, 80:Suppl. 11-24, 1989年)。ブタのフォン・ビルブラント因子に対するマウスのモノクローナル抗体は、内在の血小板の機能を発揮することなく、正常なブタに抗血栓の状態を誘発する(Bellingerら、*Proc Natl Acad Sci (USA)*, 84巻, 8100~8104頁, 1987年)。

グリコカリシンの45kdのタンパク質分解性フラグメント(GP1bフラグメント)とその誘導体は、vWFと血小板の結合反応を阻害するので、これらのペプチドは、ヨーロッパ特許出願

公開第817278号に示されているように抗血栓物質として使用し得る。オーストラリア特許出願第A087/73715号に記載されているように、vWFのフラグメントも上記の結合反応を阻害する。Vincenteら、*J Biol Chem*, 265巻, 274~280頁, 1990年には、リストセチンおよびボトロセチンで誘発されるvWFと血小板の結合反応をブロックする、GP1b由来のペプチドが開示されている。

本発明のペプチドは、vWFと、血小板が含有するGP1b-IX複合体との結合を特異的に阻害することにより、抗血栓症法の別の方法を提供する。これらのペプチドは抗血栓治療に有用な薬剤である。

発明の開示

本発明は、抗血栓物質として有用な、内皮下層に対する血小板の粘着のペプチドインヒビターに関する。このようなタンパク質のいくつかはヘビの毒中に存在することが見出され、本発明はこれらのタンパク質の精製法を提供するものである。さらに所望のインヒビターを含有するこれらの毒の同定法も示す。

したがって、1つの局面では、本発明は、vWF/GP1b-IX相互作用のインヒビターである抗血栓物質に関する。より特定すれば、これらのペプチドは、GP1b-IXに結合して、vWFが結合するのをブロックすると考えられる。これらの抗血栓物質は、血小板粘着物質と総称する。本明細書に記載されているヘ

ビ毒中に見出された血小板粘着物質は、各々12~14kdの2つの異なるサブユニットがジスルフィド結合されて構成される24~28kdのペプチドである。ペプチド粘着物質の2つの各サブユニット間には、有意な配列の相同性が存在する。

別の局面では、本発明は、本発明の血小板粘着物質を提供する、ヘビ毒を含む生物液体の同定方法に関する。

さらに他の局面では、本発明は、本発明の血小板粘着物質を用いて血栓症を予防もしくは改善する方法およびその粘着物質を含有する製剤組成物に関する。

図面の簡単な説明

図1は、NH₄OAcグラジエント溶離液を用いC₁₈セファロースで精製されるC8H GP1bインヒビターを254nmの波長光の吸光度でモニターしているクロマトグラムを示す。

図2は、被検C8H GP1bインヒビターのRPLC(C₁₈, アセトリル/TPAグラジエント溶離液)によるイオン交換精製法由来で、214nm波長光でモニターされている活性画分を示す。

図3は、図2に示す活性画分について実施したSDS-PAGEの結果を示す。

図4は、C₁₈カラムで精製されたC8H-BのRPLCクロマトグラムを示す。

図5は、C₁₈カラムで精製されたC8H-AのRPLCクロマトグラムを示す。

図6は、シー・エイチ・ホリダス(C. E. horridus)のGP1b

インヒビターの α および β 鎖のアミノ酸配列を示す。

図7は、ボトロセチンによって誘発される、 125I -フォン・ビルブランド因子の固定洗浄血小板への結合の、CH β -B GP1bインヒビターによる用量依存性阻害を示す。

図8は、セラステス・セラステス (*Cerasiopsis cerasica*) 由来のVCCGP1bインヒビターのC α カラムによる精製のRPLCクロマトグラムを示す。

図9は、PRP中でのリストセチン誘発血小板凝集反応の、精製クロタラス・エイチ・ホリダス (*Crotalus h. horridus*) 抗粘着物質による用量依存性阻害 (上方のグラフ) と、セラステス・セラステス抗粘着物質による凝集反応の用量依存性阻害を示す。

発明の実施態様

本発明の血小板抗粘着物質は、抗血栓物質としてのその挙動に関連する明白なインヒビト特性をもっている。本発明の抗粘着物質はすべて、ADP、コラーゲンおよびトロンビンによって誘発される血小板凝集反応を阻害できないので、これはGP1b-IIIaに結合するP β のインヒビターではなく、その血小板凝集反応を阻害しない。しかし、本発明の抗粘着物質は、Allain, J. P. ら、*J. Lab. Clin. Med.* 85巻、818頁、1975年およびRead, M. S. ら、*J. Clin. Lab. Med.* 101巻、74頁、1983年に記載されているような標準のアッセイでは未刺激の血小板の凝集反応を防止する。また本発明の抗粘着物質は、Ruggeri, C. M. ら

するヘビ毒のような粗原料については好ましくない)。

2) 凝集vWFの血小板との結合の阻害

本発明の抗粘着物質は、放射性標識、ビオチンまたは他の方法で標識をつけたvWFの血小板に対する、リストセチンもしくはボトロセチンによって誘発される結合反応もまた阻害する。血小板は洗浄された血小板として提供され得、アッセイは、Ruggeri ら、*J. Clin. Invest.* 72巻、1-12頁、1983年 (上記文献) に記載されているのと同様にして、ELISAプレートに結合させたグリコカリシンに対して、または任意の適切な形態の血小板もしくはGP1b-IIIaに対して実施し得る。

したがって一般に、本発明の抗粘着物質は、リストセチンもしくはボトロセチンで誘発された血小板凝集反応を阻害する性能を測定するアッセイと、リストセチンもしくはボトロセチンで誘発されたvWFが血小板と結合するのを阻害する性能を測定するアッセイの両方で陽性である。しかし本発明の抗粘着物質は、フィブリノーゲンがGP1b-IIIaレセプターと結合するのを阻害しない。

抗粘着物質の起源の同定

ヘビ毒のような生物液体は、本発明の血小板抗粘着物質を含有するが、上記のような、固定し洗浄された血小板によるリストセチン/ボトロセチン誘発凝集反応の阻害アッセイ、

J. Clin. Invest. 72巻、1-12頁、1983年のアッセイのような標準アッセイを用いた場合、標識をつけたvWFの洗浄血小板への結合を阻害する。

以下に述べるのは、本発明の血小板抗粘着物質が明確な試験結果を示すアッセイである。

1) 血小板のリストセチンまたはボトロセチンによる凝集の阻害:

このアッセイでは、Brinkhaus, A. M. ら、*Math. Enzymol.* 169巻、149-143頁、1983年に記載されているようにして調製した、ホルムアルデヒドで固定し洗浄した血小板を、Thorell, L. ら、*Thromb. Res.* 33巻、431-430頁、1984年に記載されているのと同様にして調製した精製vWFと混合し、次いで抗生物質のリストセチンまたはヘビ毒凝集素のボトロセチンによって凝集反応を開始させる。血小板に対する抗粘着活性を試験する物質の濃度を増大させたものを、凝集反応誘発物質を添加する前に、vWFの存在下、固定血小板とともに1分間インキュベートする。凝集反応は、Chronolog Corporation (米国、ペンシルベニア州、パータウン) が供給しているような市販の血小板凝集計 (aggregometer) で測定され、vWFとGP1b-IX複合体の結合反応の尺度となる。

(いくつかの試料は、固定血小板アッセイの代わりに、血小板が豊富な血漿 (platelet-rich plasma, PRP) 中で試験し得るが、前者の形態のアッセイは、高濃度の凝固酵素を含有

またはvWFの、血小板が含有するGP1b-IX複合体への結合の阻害を測定するアッセイを用いて有効に同定される。

活性のある候補物質は、単離・精製された形態で血小板抗粘着物質を得るために精製工程に付される。サイズクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーおよび逆相HPLCのような各種のタンパク質精製法を使用し得るが、代表的で有効な方法は次のとおりである。

凍結乾燥された形態の粗毒約10-1000mgを希酢酸 (0.1M) で再構成し、次にセファデックス0-50のようなサイジングカラムに入れ、次に同じ緩液中で溶離する。酢酸を除くために凍結乾燥した後、先に述べたような、固定され洗浄された血小板と精製vWFとのボトロセチンもしくはリストセチンで誘発された凝集のアッセイを利用して、各成分を抗粘着活性について検定する。

サイジングカラムから同定された活性成分を次に、そのヘビ毒中の抗粘着物質のイオン電荷によって、カルボキシメチル (CM) -セファシルまたはジエチルアミノエチル (DEAE) -セファシルのカラムに吸着させ、次に、イオン強度を増大させながら用いる酢酸アンモニウム緩衝液でカラムから溶離させる。カラムから得た成分を再び凍結乾燥して上記の凝集性試験を除き、次いで上記の血小板凝集アッセイを利用して検定する。(多くの粗ヘビ毒中に存在する凝固活性が活性成分から除去されたとき、場合によっては、この段階で、血小板の豊富な血漿 (PRP) を固定・洗浄された血小板の代わりに用い

得る)。

イオン交換スチラップから得た活性画分は次に、VrdacのようなC₁₈EPLCカラムの調製用逆相液体クロマトグラフィー(EPLC)を用い、アセトニトリル(8~10%アセトニトリル)および0.1%TPA/H₂Oを含有するグラディエント液で溶離して精製し得る。グラディエント液の濃度の勾配と流量は、通常の方法を用いて最適化される。活性画分は、この場合は血小板凝集剤としてPRPを用い、前記の血小板凝集アッセイによって決定される。得られた活性画分をブールし、濃縮し、次いで分析用のEPLCもしくはSDS-PAGEを用いて均質性について試験する。

上記のまたは他の精製法によって得ることができる本発明の抗粘着物質には、下記の一からなる群から選ばれる等から得られる物質が含まれる。すなわちアグキストロドン・アクトス(Akistrodon actus)、アグキストロドン・ハリス・プロモフィ(Akistrodon halia blomhoffii)、アグキストロドン・コントルトリックス・モカセン(Akistrodon contortrix mokasen)、ビティス・アリエタンス(Bittia arifiana)、ビティス・コーダリス(Bittia sandalia)、ビティス・ガボニカ(Bittia gabonica)、ビティス・ジー・リノセロス(Bittia s. rhinoceros)、ボスロプス・アスパー(Bothrops asper)、ボスロプス・アルタナータ(Bothrops alternata)、ボスロプス・アトロックス(Bothrops atrox)、ボスロプス・コチアラ(Bothrops cotilara)、ボスロプス・ジャララカ(Bothrops jararaca)、ボスロプス・ニューイーディ(Bo-

throps newiedi)、ボスロプス・メデューサ(Bothrops medusa)、ボスロプス・シュレグリー(Bothrops schlegelii)、セラステス・セラステス(Cerastes cerastes)、セラステス・バイベラ(Cerastes vipers)、クロタルス・アダマンテネウス(Crotalus adamanteus)、シ・アルトックス(G. alrax)、シ・バシリカス(G. basilica)、シ・ジュリス・トナタカス(G. durissus totonaticus)、シ・エイ・ホリダス(G. h. horridus)、シ・エム・モロクス(G. m. molossus)、シ・ルバー(G. ruber)、シ・スクラタス(G. scutellatus)、シ・ブイ・セバリス(G. v. s. sebae)、シ・ブイ・ヘレリ(G. v. helleri)、シ・ブイ・ルトス(G. v. lutosus)、シ・ブイ・オレガヌス(G. v. oreganus)、エキス・カリナツス・ソクレキ(Echis carinatus sochureki)、エリステムコフィス・マクマホニー(Eristicophis macmahoni)、プソイドセラステス・ペリクス(Pseudocerastes perleus)、シストルルス・エム・バルボーリ(Sistrurus e. barbouri)、シストルルス・シ・ターゲミナス(Sistrurus g. tergeminus)、トリメレスルス・フラボビリディス(Trimeresurus flavoviridis)、トリメレスルス・グラミニウス(Trimeresurus gramineus)、バイベラ・レベティナ(Vipera lebetina)、バイベラ・アモンディチス(Vipera ammodytes)、バイベラ・パラストイナエ(Vipera palaestinae)、およびバイベラ・アール・ルセリ(Vipera a. russelli)からなるヘビの群から選

択される。

本発明の精製血小板粘着インヒビターは、次に標準法を用いて配列が決定される。全ペプチドは一般に、未変性タンパク質中のシステイン残基の還元とアルキル化によって配列を決定され得、この処理によって個々のサブユニットを分離し得る。個々のサブユニットはタンパク質分解反応によって消化されてフラグメントを生成しそのフラグメントはEPLCを用いて分離され、ついでそのタンパク質の配列が、Applied Biosystems 473A Protein Sequencerのような自動タンパク質シーケンサーを用いて決定される。

あるいはそのタンパク質の全配列は、ヘビの組織のクローン化DNAライブラリーから抗粘着物質をコードするDNAを検索することによって決定され得る。このようなDNAを得る各種の方法が知られるが、抗粘着物質に対する部分的なアミノ酸配列に基づいて設計されたオリゴヌクレオチドのプロブによってスクリーニングする方法、または精製抗粘着物質に対して調製された抗体を用いる免疫スクリーニング法がある。

組換え産物および他の合成産物

本発明の血小板抗粘着物質(PAA)は、組換え法の使用を含む各種の方法で産生することができる。

未変性のPAAまたはその変異体をコードする遺伝子は、各種の組換え系を用いて操作して発現し得る。適切な構造の

発現系があれば、翻訳されたタンパク質をプロセッシングしない宿主系を使用し得る。例えばその発現系は、任意の隣接配列を適切に修飾することにより、所望のN末端のすぐ前にATG開始コドンで配置し、かつ所望のC末端の後に終止コドンで配置することによって構築される。次に所望のコーディング配列を、所望どおりに、原核もしくは真核の宿主内で機能する制御系に、作動可能な結合で連結される。現在、多数の制御系が当該技術分野で公知である。

PAAのプロセッシングが所望の場合は、ある種の真核系が有利である。組換え宿主を選択するには注意しなければならない。この選択がプロセッシングの性質を決定する。また、タンパク質分解酵素もしくはグリコシル化酵素により、切断またはグリコシル化され易いと考えられる位置の置換アミノ酸をコードするために遺伝子配列を改変することによって、プロセッシングを中断し得る。例えばアルギニンまたはリシンをトレオニン残基で置換すれば、生成したペプチドは、それらの部位でトリプシンによって切断されにくくなる。あるいは、発現は、これらのペプチドのプロセッシングを行うことができる酵素の欠乏する宿主内で行われ得る。

PAAをコードする遺伝子は、PAAをコードするDNAで構築されたプロブまたは抗PAA抗体が入手できれば得られるので、これらの遺伝子は、部位特異的突然変異誘発法で1つ以上のアミノ酸に対するコドンで置換することによって操作し得、PAA活性を保持するこれらのペプチドのアナ

ログをコードする配列を得ることができる。

発現ベクターの構築と、適正なDNA配列の組換え法による産生は、当該技術分野でそれ自体公知の方法で行われ得る。

発現は原核または真核系で行われ得る。原核系は、イー・コリ (*E. coli*) の各種の菌株で代表される場合が最も多い。しかし他の微生物の菌株も使用し得、例えば、バシラス・サチリス (*Bacillus subtilis*) のような桿菌類、シェードモナス (*Pseudomonas*) 属の各種の種、または他の細菌菌株がある。このような原核系では、宿主と適合性の種由来の複製起点および制御配列を含むプラスミドベクターが用いられる。例えば、イー・コリは、一般に、pBR322すなわちイー・コリの種由来のプラスミドの誘導体、またはpUCシリーズのベクターを用いて形質転換される。通常用いられる原核制御配列は、本明細書では、リボソーム結合部位の配列とともに任意にオペレーターを有する転写開始のプロモーターを含有すると定義され、 β -ラクタマーゼ (ベニシリナーゼ) とラクトース (*lac*) のプロモーター系のような通常用いられるプロモーター系が含まれるが、原核生物と適合性のトリプトファン (*trp*) プロモーター系および λ 由来P_Lプロモーター系を使用し得る。

真核宿主に有効な発現系は、適切な真核遺伝子由来のプロモーターを含有する。酵母に有効な各種のプロモーターは、例えば、3-ホスホグリセリン酸キナーゼの合成を行うプロモーターを含む、解糖酵素合成を行うプロモーターを持

っている。他のプロモーターとしては、Y₂、13から得られるエノラーゼ遺伝子またはLeu2遺伝子由来のプロモーターがある。

適切な哺乳類のプロモーターとしては、メタロチオネインプロモーター、SV40由来の初期もしくは後期のプロモーター、またはポリオーマ、アデノウイルス11、ウレ乳頭腫ウイルスもしくはトリ肉腫ウイルスのような他のウイルスプロモーターがある。適切なウイルスおよび哺乳類のエンハンサーも使用し得る。植物の細胞が発現系として用いられる場合は、ノバリン合成のプロモーターが適切である。昆虫細胞もまた、バキュロウイルスに基づいた発現系とともに宿主として使用し得る。

発現系は、標準の方法を用い、当該技術分野で公知の標準の連結法および制限法を採用して、PAAをコードする配列に前記の制御要素を作動可能に連結することによって構築される。単離されたプラスミド、DNA配列、または合成されたオリゴヌクレオチドは、切断され、仕立てられ、所望の形に再連結される。

構築されたベクターで適切な宿主を形質転換させる。使用される宿主細胞によって、その細胞に適した標準の方法を用いて形質転換が実施される。形質転換された細胞は、次に、PAAをコードする配列の発現に有利な条件下で培養され、ついで組換え法で産生されたタンパク質が培養物から回収される。

組換え法による産生に加え、その複合配列が直接ペプチド合成を実施できる程度に十分に短いペプチドを、標準の固相法を用いて調製し得る。

したがって、本発明の適用範囲内の化合物は、当該技術分野で公知の手段、例えば固相ペプチド合成法によって化学的に合成し得る。この合成は、 α -アミノ保護アミノ酸を用いてペプチドのカルボキシ末端から開始される。他の保護基が適切であっても、*t*-ブチルオキシカルボニル (Boc) 保護基はすべてのアミノ基に対して使用することができる。例えばBoc-Val-OH、Boc-Leu-OH、Boc-Arg-OHまたはBoc-Tyr-OH (すなわち選択されたBNPアナログのカルボキシ末端のアミノ酸) は、クロロメチル化ポリスチレン樹脂の支持体に対してエステル化され得る。このポリスチレン樹脂の支持体は、阻触剤としてのジビニルベンゼンが約0.5~2%となる、スチレンとのコポリマーが好ましく、この阻触剤によって、ポリスチレンポリマーはある種の有機溶媒に対して完全に不溶性になる (Stevytら、*Solid-Phase Peptide Synthesis*, 1969年、米国、サンフランシスコのW.E. Freeman Co., およびMerrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85巻、2149~2154頁、1963年参照)。またこれらのおよび他のペプチド合成法は、米国特許第3,852,925号、同第3,842,087号、同第3,972,859号および同第4,108,402号に開示されている。

この合成は、手動法を用い得るが、または、例えばApplied Biosystems 430Aもしくは431Aペプチド合成器 (米国、カリ

フォルニア州、ホスターシティ) を、メーカー提供の指示マニュアルに記載されている指示事項にしたがって用いて自動的にに行い得る。

当然、自動合成法も配列の制御を行い得るので、上記のように遺伝子を改変することによって得られるアミノ酸配列に対する上記の改変は、この合成法を用いて得られる。さらに、置換アミノ酸は遺伝子によってコードする必要はない。従って、D型アミノ酸もしくは β アミノ酸が天然に存在しているアミノ酸の代わりに用いられ得る。

抗粘着剤に対する抗体の調製

本発明の血小板抗粘着剤はまた、本発明の化合物に対して免疫特異的な抗血清を得るため、免疫化プロトコルに利用し得る。得られたPAA化合物は、次いで、マウス、ウサギなどの適切な哺乳類の被験体に注射し得る。適切なプロトコルは、血清中に抗体の産生を上昇させる計画にしたがって、アジュバントの存在下、免疫原を繰返し注射することを含む。免疫血清の力価は、当該技術分野で現在標準になっている免疫検定法を用い、本発明の化合物を抗原として用いることによって容易に測定することができる。

得られた抗血清は直接使用し得、またはモノクローナル抗体が、免疫化動物の末梢血液リンパ球もしくは脾臓を採集し、その抗体産生細胞を不死化し、次いで標準の免疫検定法を用いて適切な抗体産生体を同定することによって得ることがで

き。

比較的小きなハプテン類である本発明のいずれの化合物も、通常用いられるキーホールリンペットヘモシアニン (KIL) のような抗原として中性の担体、または血清アルブミン担体に有利に連結される。担体への連結は、当該技術分野で一般に公知の方法で行い得る。連結はジクロロヘキシルカルボジイミド、または他のカルボジイミド脱水剤のような結合剤を用いて実施し得る。この連結を行うのにリンカー化合物も使用し得、同種の二官能性のリンカーおよび異種の二官能性のリンカーは、米国、イリノイ州、ロックフォードの Pierce Chemical Company から入手できる。

投与および効用

本発明の血小板粘着インヒビターは、血小板の粘着および血栓の生成を防止し、かつ血管形成術のような侵襲性方法を行った後の動脈の再狭窄を防止するのに治療上有用である。このような治療法を行うのに適した症状には、限定はないが、アテローム性動脈硬化症および動脈硬化症、急性心筋梗塞、慢性不安定狭心症、一過性脳虚血発作、末梢血管の疾病、動脈血栓症、予かん前症、血栓症、ならびに血管形成術、頸動脈血管内膜切除術、血管移植片の吻合術および心臓血管器具（例えば留置カテーテルもしくはシャント“体外循環装置”）の長期間の使用の後に起こる、再狭窄および/または血栓症が含まれる。これらの症候群は各種の狭窄性と閉塞性の血管

障害を示すが、これらの障害は、血小板の粘着で始まり、次いで血小板が活性化され、血管壁の新生内膜層の血管平滑筋が増殖して、再狭窄に至る原因である強力な成長因子を含有する、血小板顆粒の内物が放出され、続いて損傷した動脈の管壁に血小板血栓が生成すると考えられる。

本発明の血小板粘着インヒビターは、不安定狭心症および動脈の血栓症もしくは血栓症における動脈血栓の形成の防止もしくは停止、ならびに心筋梗塞 (MI) および MI が起こった後の慢性血栓生成の治療もしくは防止に使用し得る。本発明の血小板粘着インヒビターは、血小板が粘着し、続いて動脈の再閉塞が起こるのを阻害するために、ストレプトキナーゼまたはプラスミノゲン活性化因子のような血栓溶解剤とともに投与し得る。

さらに、これらの抗血栓剤は、器管の移植が原因で起こる血栓症と再狭窄を抑制するのに使用し得、そして血栓症によって仲介される器管の拒絶反応および移植で誘発されるアテローム性動脈硬化症の防止に使用し得る。

血小板粘着インヒビターの投与量は、所望の作用と治療計画によって広範囲に変化させ得る。一般に投与量は約 0.001 ~ 10 mg/kg 個体の体重である。投与は、好ましくは、静脈投与のような非経口で、毎日、1 週間まで、または 1、2 ヶ月間もしくはそれ以上行うが、治療のスケジュールによって変化する。血小板粘着インヒビターのペプチドフラグメントを使用する場合は、鼻内、舌下などのような他の経路を利用し

得る。

注射剤は次のような通常の形態で調製し得る。すなわち液体の溶液または懸濁液、注射に先立ち溶液または懸濁液にするのに適した固体の形態、またはエマルジョンである。適切な賦形剤は、例えば水、食塩水、デキストロース、マンニトール、ラクトース、レチン、アルブミン、グルタミン酸ナトリウム、システイン塩酸塩などである。さらに、目的により、注射用医薬組成物は、少量の非毒性補助物質、例えば緩衝剤、pH 緩衝剤などを含有し得る。目的により、吸収促進剤（例えばリポソーム膜）を利用し得る。

以下に記載する実施例は例示を目的とするものであり、本発明を限定するものではない。

実施例 1

血小板粘着剤を含有するヘビ毒の固定

アッセイを行うために、精製ヒト vWF を、Thorell らの前期文献の方法を用いて、ヒト血漿の冷却沈降物から調製し、Brinkhous および Read の前期文献に記載されているのと同様にして、ホルムアルデヒドで固定し洗浄した血小板を調製しアッセイした。リストセチン (1.5 μg/ml 最終濃度) またはボトロセチン (10 μg/ml 最終濃度) を用いて血小板凝集反応を開始させた。

Sigma Chemical Company 社 (米国、ミズーリ州、セントルイス) または Miami Serpentarius Labs 社 (米国、ユタ州、ソ

ルト・レーク市) から入手した 73 種の凍結乾燥したヘビの粗毒液の 10 mg/ml 蒸留水溶液を、Centricon-10 および Centricon-30 (YM Membrane) のマイクロコンセンレーター (Amicon 社、米国、マサチューセッツ州、ダンバース) を用いて調製用限外濾過に付した。濾液 (10 μl と 50 μl の試料) および保持液 (10 μl と 50 μl の試料) 両方を、調製した固定・洗浄血小板を精製 vWF とともに使用する、血小板凝集アッセイに試験試料として使用した。阻害活性は、Centricon-10 および同-30 の限外濾過で得た保持液試料にのみ見いだされた。結果を表 1 に示す。

(以下余白)

表 1
抗-GP1b活性に強い凝集した人血漿
(Centricon-30 保持液)

種名	活性
Elapidae	
Bungarus caeruleus	-
Bungarus fasciatus	-
Dendroaspis jamesoni	-
Naja naja	-
Naja melanoleuca	-
Notechis scutatus scutatus	-
Ophiophagus hannah	-
Pseudechis porphyriacus	-
Pseudonaja textilis textilis	-
Tropidechis carinatus	-
Viperinae	
Bitis arietans	+
Bitis caudalis	+
Bitis gabonica	+
Bitis g. rhinoceros	+
Bitis nasicornus	-
Causus rhombeatus	-
Cerastes cerastes	+
Cerastes vipera	+
Echis carinatus sochurecki	+
Echis carinatus leakeyi	+
Eristicophis macmahoni	+
Hypnale hypnale	+
Pseudocerastes persicus	+
Vipera ammodytes	+
Vipera aspis	-
Vipera berus	-

表 1 (続)

Vipera lebetina	+
Vipera palestinae	+
Vipera r. russelli	+
Crotalinae	
Agkistrodon acutus	+
Agkistrodon bilineatus	-
Agkistrodon c. contortrix	-
Agkistrodon c. laticinctus	-
Agkistrodon c. mokasen	+
Agkistrodon h. blomhoffi	+
Agkistrodon p. leucostoma	-
Agkistrodon p. piscivorus	-
Agkistrodon rhodostoma	-
Bothrops atrox	+
Bothrops asper	+
Bothrops alternatus	+
Bothrops cotiara	+
Bothrops jararaca	+
Bothrops lansbergi	-
Bothrops medusa	+
Bothrops nasuta	-
Bothrops newiedi	+
Bothrops pradoi	-
Bothrops schlegli	+
Crotalus adamanteus	+
Crotalus atrox	+
Crotalus basiliscus	+
Crotalus cerastes	+
Crotalus d. durrius	+
Crotalus d. tontonatus	+
Crotalus d. terrificus	-

表 1 (続)

Crotalus h. horridus	+
Crotalus m. molossus	+
Crotalus r. ruber	+
Crotalus scutalatus	+
Crotalus v. cereberus	+
Crotalus v. concolor	-
Crotalus v. helleri	+
Crotalus v. lutosus	+
Crotalus v. oreganus	+
Crotalus v. viridis	+
Sistrurus c. tergeminus	+
Sistrurus m. barbouri	+
Trimeresurus albolabris	+
Trimeresurus elegans	+
Trimeresurus flavoviridis	+
Trimeresurus gramineus	+
Trimeresurus purpureomaculatus	+
Trimeresurus wagleri	-

抗粘着活性は、ViperinaeおよびCrotalinaeの全種ではなく一部の種にみられたが、試験したElapidaeの全種にはみられなかった。

実施例 2

Crotalus horridus horridus毒からの
血小板抗粘着物質の精製

0.5M酢酸7.0ml中、Crotalus horridus horridus毒300mg (Mitsui Serpenterium Labs. Lot #CH1852) の溶液を、0.5M酢酸で平衡化したセファダックスG-50 (fine) (Pharmacia 2.5×100cm) のカラムにかけ、溶出した。カラムは、流速2ml/時で溶出し、5ml固分を採集した。各固分の10μlを10固分1グループとしてプールし(即ち、固分1-10、11-20、21-30等)、分析のために凍結乾燥した。この凍結乾燥固分は、蒸留水300μl中に再懸濁し、そしてその適量を取り、精製VWFで再精製された固定化洗浄血小板の、リストセチンで誘発される血小板凝集の阻害活性を測定した。このアッセイにより活性のある阻害固分(31-40)をプールし、凍結乾燥することにより、白色非結晶粉末35mgを得た。

この物質を、5mlの0.01M NH_4OAc 、pH4.5中に溶解し、そして0.01M~0.5M NH_4OAc 、pH6.5で平衡化したカルボキシルセファクリルカラム(2.2×12cm)にかけ、固分(12ml)を採取した。このカラムは、UV吸収により固分を同定するため、234nm/1.0 AUFSでモニターした(図1)。UV吸収固分は、固分毎に凍結乾燥し(各20μl)、蒸留水1ml中に再懸濁し、そしてその血小板凝集を阻害する能力を測定した。固分13~17が阻害活性を示し、そして過剰の NH_4OAc を除くため、各固分を H_2O を用いて8回凍結乾燥した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(非還元)によるピーク阻害固分の分析により、Mr=23-28kdに泳動する2種の主要タンパクが認められた。これらの固分(100μg)を、逆相

C₁₈液体クロマトグラフィー (Vydac 214TP54, 0.46×25cm, 流速1.0ml/分, 300A, 15%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸 (TPA) ~70%アセトニトリルのグラジエント抽出30分) で分析すると、2つの主要なUV (214nm) 吸収ピークが認められ (図2)、これを無め、そして乾燥した。SDS-PAGEによ、これら2つのピークを再分析すると、より速くHPLC抽出するピークは、CBB-A (24.9分) として、Mr=28kdに泳動され、そしてより速く抽出するピークは、CBB-B (25.6分) として、Mr=25kdに泳動された (図3)。還元SDS-PAGEでは、CBB-AおよびCBB-Bは2つの別個のタンパク質Mr=12-15kdに分解された。未変性のCBB-AおよびCBB-Bは、共に、洗浄系のボトロセチンおよびリストセチンで誘発される血小板凝集を阻害し、そして血小板に含む血漿中の凝集も同程度に阻害した。

CBB-AおよびCBB-Bのイオン交換固相からの分取精製は、分析用分析と同じグラジエント抽出条件を用いて、セミ分取C₁₈ (214TP510, 3.5ml/分) カラム上で行った。図4は、精製されたCBB-Bの分析C₁₈ HPLCクロマトグラムを示し、そして図5は、CBB-Aのクロマトグラムを示す。(各図の34分におけるピークは雑音 (artifact))。

精製タンパク質 (CBB-B) の一部を還元し、そしてアルキル化した (6M Guanidinium·HCl, 0.25M トリス-HCl, 20mM EDTA, 20mM ジチオスレイトール (DTT) を含む, pH7.5, 8時間 35℃)。過剰のロードアセトアミドをこの還元タンパク質に加え、室温で8時間置いた。還元された、およびアルキル化

された糖は、それぞれ、C₁₈逆相HPLCを用いて分離した。より速く抽出するサブユニット (CBB-B-β) およびより速く抽出するサブユニット (CBB-B-α) は、それぞれ、Applied Biosystem 473Aタンパク質シーケンサーを用いて、N末端配列分析 (エドマン分解) を行った。

CBB-B-αについては、エドマン分解を37回繰り返すことにより、以下のN末端アミノ酸配列が得られた。Asp-Leu-Glu-Cys-Pro-Ser-Gly-Trp-Ser-Ser-Tyr-Asp-Arg-Tyr-Cys-Tyr-Lys-Pro-Phe-Lys-Gln-Glu-Met-Thr-Trp-Ala-Asp-Ala-Glu-Arg-Phe-Cys-Ser-Glu-Gln-Ala-Lys。127個のアミノ酸からなるこの糖の完全なアミノ酸配列を図6に示す。

CBB-B-βについては、27回のサイクルにより、以下のN末端アミノ酸配列を得た。Asp-Cys-Pro-Ser-Asp-Trp-Ser-Ser-Tyr-Glu-Gly-His-Cys-Tyr-Arg-Val-Phe-Gln-Gln-Glu-Met-Trp-Asp-Asp-Ala-Glu-Lys-Phe。この糖の完全なアミノ酸配列は図6を示す。

精製ペプチドCBB-Bは、Ruggieri (前述) の方法に従って、vWF血小板結合アッセイで試験した。結果は、図7に示す。結合阻害は、用量依存性であり、そして精製CBB-B濃度が200nM未満で、vWFの洗浄血小板への結合を抑制する。

実施例3

Cerastes cerastes毒からの抗粘着物質の精製

Cerastes cerastes毒 (Miami Serpenterium Labs. Lot #C

C1252) 500mgの0.5M酢酸溶液1.0mlを、0.5Mの酢酸で平衡化したセファダックスG-50 (fine) のカラム (Pharmacia, 3.5×100cm) につけ、抽出した。このカラムは40ml/時の流速とし、8ml固分をポリプロピレンチューブに採集した。各固分25μlを、10固分を1グループとしてプールし (1-10, 11-20, 21-30等)、そして凍結乾燥した。凍結乾燥固分は、蒸留水100μl中に再溶解し、そしてその一定量をとり、精製vWFにより再凝集された固定化洗浄血小板のリストセチンで誘発される血小板凝集の阻害活性をアッセイした。このアッセイにおける活性固分 (固分21-40) をプールし、そして凍結乾燥して190mgの白色粉末を得た。

この物質を、10mlの0.01M NH₄OAc, pH4.5中に溶解し、そしてCM-セファロースカラム (3.2×18cm) に流した。0.01M~0.5M NH₄OAc, ~pH6.5のpHおよび塩のグラジエントを行い、そして固分 (10ml) をポリプロピレンチューブに採集した。カラム抽出液は、UV吸収により固分を同定するために、254nm/1.0ADFSでモニターした。各固分からの25μlを、10固分のグループに再度プールし、そして凍結乾燥した。この固分を、蒸留水100μl中に再溶解し、そしてその血小板凝集阻害活性をアッセイした。固分81-100が阻害活性を示し、集めて、過剰のNH₄OAcを除くために各固分をH₂Oにより8回凍結乾燥した。

SDS-PAGE (非還元) による阻害固分の分析により、Mr=23-28kdで泳動する染色されたバンドである1つの主要タンパク質を認めた。還元SDS-PAGEでは、未変性のタンパク質が2つ

の別個のタンパク質Mr=12-15kdに分解した。分析用C₁₈逆相液体クロマトグラフィー (Vydac214TP54, 0.46×25cm, 流速1.0ml/分, 300A) 上での30%アセトニトリル/0.1% TPAから70%アセトニトリルのグラジエント抽出、30分間、で、図8に示す1つの主要UV (214nm) 吸収ピークを認めた (27および31分のピークは雑音)。

精製されたタンパク質 (CC) の一部を還元し、そして実施例1と同様に、ロードアセトアミドでアルキル化した。このカルボキシアミドメチル化糖は、逆相Vydac-フェニルカラムを用いて分離した。より速く抽出するサブユニット (CC-β) およびより速く抽出するサブユニット (CC-α) は、それぞれ、Applied Biosystem 473A) タンパク質シーケンサーを用いてN末端配列分析を行った。

CC-βについて、エドマン分解を25サイクル行うことにより、以下のN末端アミノ酸配列を得た: Leu-Asp-Cys-Pro-Leu-Asp-Ser-Ser-Ile-His-Glu-Glu-Lys-Cys-Tyr-Lys-Val-Phe-Phe-Leu-Leu-Ile-Thr-Trp-Glu。

CC-αについて、20サイクルにより、以下のN末端アミノ酸配列を得た: Asp-Gln-Asp-Cys-Leu-Pro-Gly-Trp-Ser-Tyr-Tyr-Glu-Lys-Tyr-Cys-Tyr-Lys-Val-Phe-Glu。

実施例4

Pseudocerastes persicus毒からの抗粘着物質の精製

Pseudocerastes persicus毒 (Miami Serpenterium Labs.

Lot 8P5822) 1000mgの0.5M酢酸溶液7.0mlを、セファデックス G-50fのカラム (Pharmacia, 1.5×100cm) につけ、実施例2および3に記載のように抽出しアッセイした。活性な成分(成分31-50)をブールし凍結乾燥した。

この物質約180mgを、0.01M~0.5M H_2OAc の H_2OAc 緩衝液を用いたCM-セファロースカラム (2.1×13cm) に吸させ、グラジエント分離した。活性成分(各6ml、成分34-73)が、固定化血小板アッセイで活性であることが見いだされ、ブールし、そして揮発性塩を除くために水で数回凍結乾燥した。

最終精製を、0.1%TFA中の15~70%アセトニトリルの10分間のグラジエントを用いたセミ分取C₁₈逆相液体クロマトグラフィーにより行った。この物質の一部(300 μ g)を還元し、そして実施例2に記載の通り、カルボキシアミドメチル化した。このカルボキシアミドメチル化した膜を、前述のようにC₁₈RP LCで分離し、そして各画について8束配列分析を行った。

より速く抽出するサブユニットPB- β は、エドマン分解を50サイクル行い以下の配列を得た: Asp-Cys-Pro-Ser-Asp-Trp-Ser-Ser-His-Glu-Gly-His-Cys-Tyr-Lys-Val-Phe-Asn-Leu-Tyr-Lys-Thr-Trp-Glu-Asp-Ala-Glu-Lys-Phe-Cys-Thr-Glu-Gln-Ala-Asn-Gly-Oly-His-Leu-Val-Ser-Ile-Asp-Ser-Lys-Lys-Glu-Ala-Asn-Phe。

PP- α 膜は、31サイクルで以下の配列を得た: Ala-Leu-Asn-Cys-Ala-Ser-Oly-Trp-Ser-Ala-Tyr-Asp-Gln-His-Cys-Tyr-Lys-Ala-Phe-Asp-Glu-Pro-Lys-Ser-Trp-Ala-Asp-Asp-Glu-Lys

-Phe。

実施例5

Vipera r. russelli毒からの血小板粘着物質の精製

実施例2-4の方法を用いて、Vipera r. russelliの毒1gを精製し、GPIIbインヒビターをた。精製したインヒビターの一部を、実施例3-4に記載の通り、カルボキシアミドメチル化し、そしてそのサブユニットをC₁₈RP LCで分離した。

より速く抽出するサブユニットの8束配列を、22サイクルのエドマン分解で、以下のアミノ酸配列を得た。Gly-Phe-Ser-Cys-Pro-Asn-Gly-Trp-Ser-Ser-Phe-Gly-Arg-Tyr-Cys-Tyr-Lys-Pro-Ile-Glu-Pro-Leu。

実施例6

ボトロセテン/リストセテンで誘発される

凝集の阻害

実施例2で調製したように、C. horridus horridusから精製されたタンパク質、および実施例3で調製したように、C. scutellatusから精製されたタンパク質を、前述のように、PRPを用いたボトロセテン/リストセテンで誘発される凝集阻害アッセイを行った。その結果を図9に示す。再び、用量依存的作用が示され、2-3 μ g/mlの低濃度で阻害を示す。

CHH GPIIb インヒビターのイオン交換精製

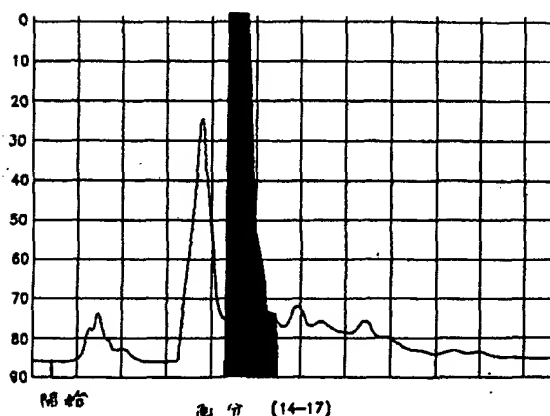


FIG. 1

CROTALUS H. HORRIDUS GPIIb インヒビターの RPLC 精製

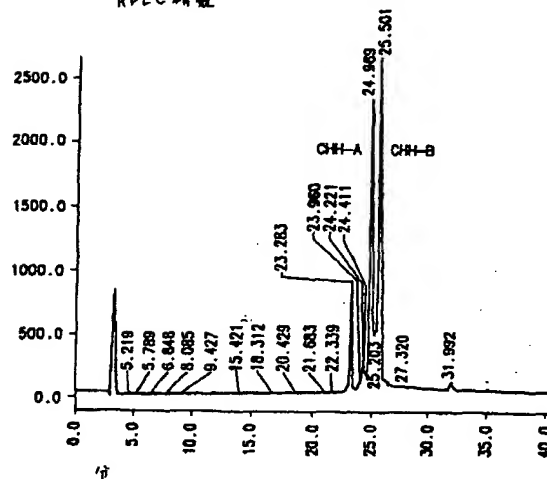
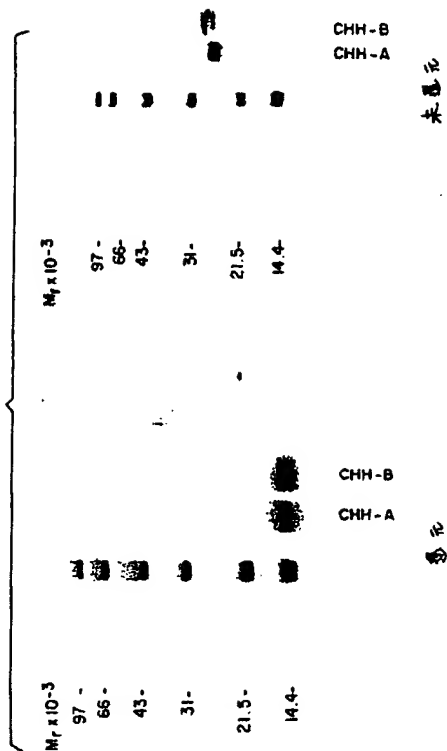


FIG. 2

FIG. 3



CROTALUS H. HORRIDUS GP1b 還元後
CHH-Bの分析 RPLC

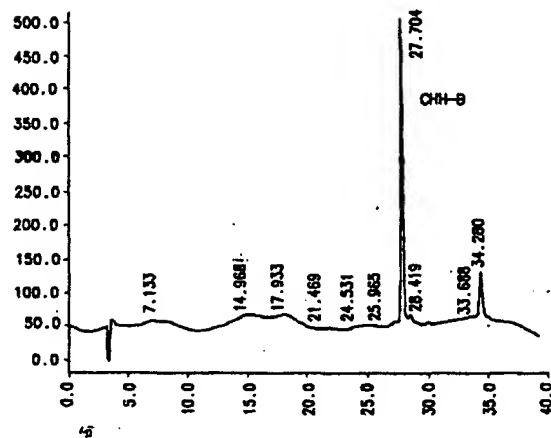


FIG. 4

CROTALUS H. HORRIDUS GP1b 還元後
CHH-Aの分析 RPLC

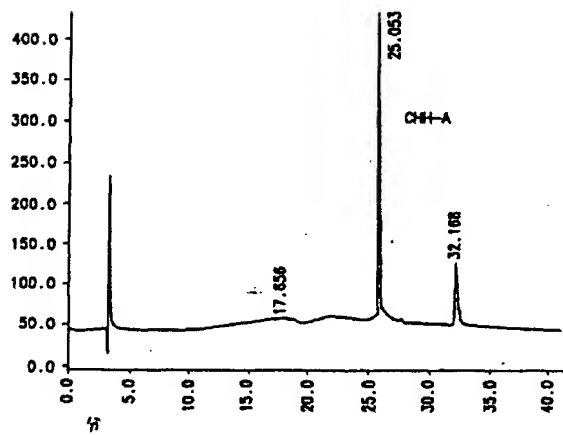


FIG. 5

CROTALUS H. HORRIDUS GP1b 還元後

CHH-Aの分析

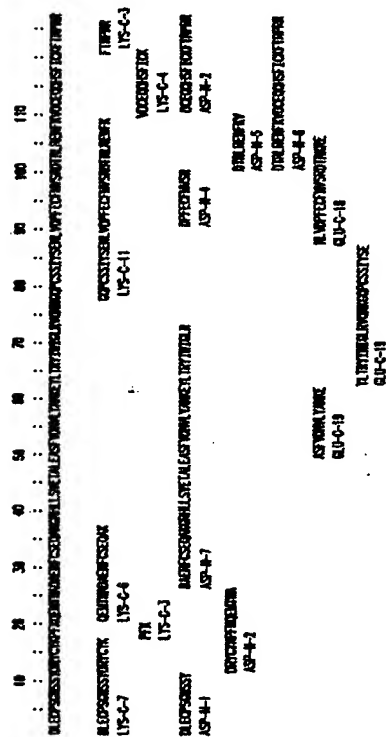


FIG. 6A

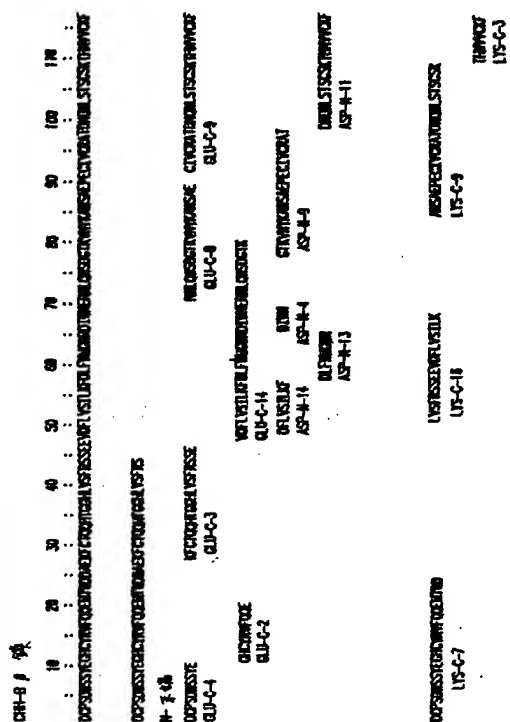


FIG. 6B

CHH-BにF₂固定化血小板の¹²⁵I-VWF結合の阻害

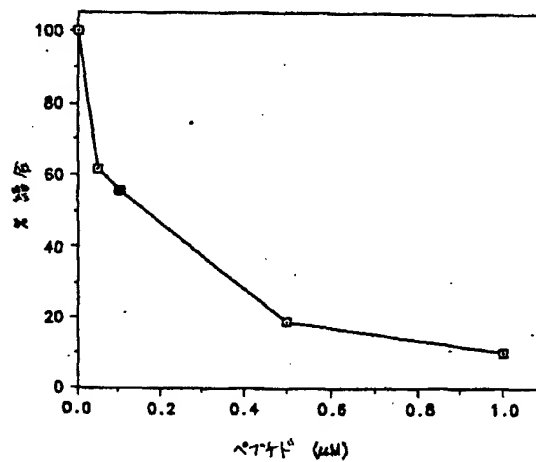


FIG. 7

CERASTES CERASTES GPIb インヒビター
分析 RPLC

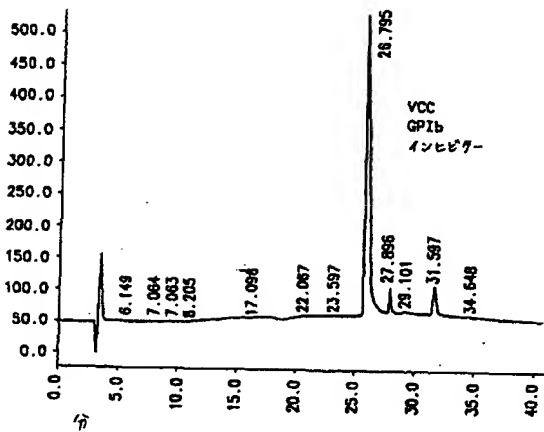


FIG. 8

GPIb インヒビターによるPRP凝集の阻害

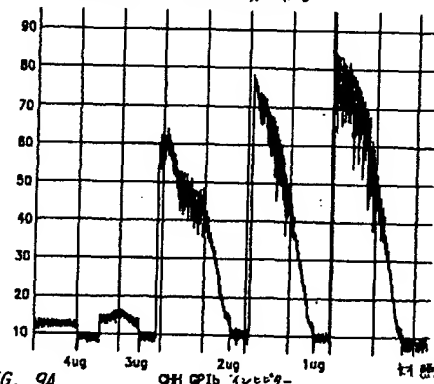


FIG. 9A

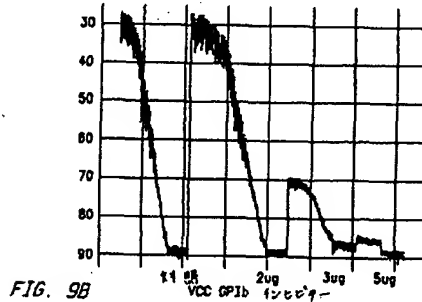


FIG. 9B

Form PC 905-A/310 (second page) (Rev. 1-22-81)

Form DET-104 (12) Instructions (Rev. 11-2010) 4-0000

Form PET-9A (7/8) INFORMATION ON FORM (1/8) 10010